

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. April 2003 (10.04.2003)

PCT

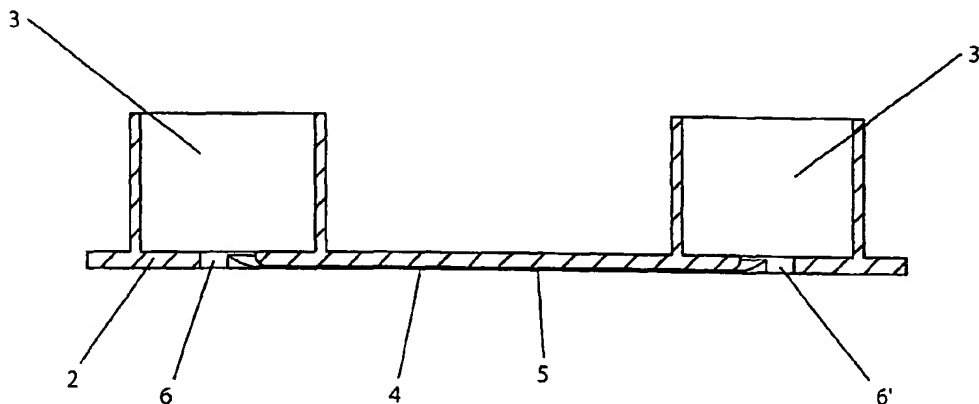
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/029788 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 21/05** 201 16 019.6 28. September 2001 (28.09.2001) DE
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/10770 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **IBIDI GMBH** [DE/DE]; Gründerzentrum Physik, Schellingstr. 4, 80799 München (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum:
25. September 2002 (25.09.2002) (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KAHL, Johan-Valentin** [DE/DE]; Neustätterstrasse 1, 80636 München (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwalt: **WEIGELT, Udo**; Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, Maximilianstrasse 58, 80538 München (DE).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 48 210.8 28. September 2001 (28.09.2001) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: FLOW CHAMBER

(54) Bezeichnung: FLUSSKAMMER



(57) **Abstract:** A flow chamber (1), made from plastic as object support for light microscopy investigations, comprises at least one channel (4) with a width of 0.01-20.0 mm and a height of 0.01 -5 mm in a base plate (2). A fluid reservoir (3, 3') is connected to the inlet and outlet opening (6, 6') of the channel generating a communicating system. The base and/or lid of said chamber is made from high optical quality plastic and can be functionalised. The inlet and outlet regions of the channel are embodied with a bevelling (7) of the channel edges, or a surface treatment, such that no drops are formed and thus no restriction of flow occurs. In a method for sample preparation for light microscopy investigations a sample flow through a system of communicating tubes is generated, in which a reservoir of a solution containing the sample is connected by means of a thin line to at least one further reservoir and the fill levels of the reservoirs are different at the beginning of the investigation.

(57) **Zusammenfassung:** Eine Flusskammer (1) aus Kunststoff als Objektträger für licht-mikroskopische Untersuchungen weist in einer Grundplatte (2) wenigstens einen Kanal (4) mit einer Breite von 0,01-20,0 mm und einer Höhe von 0,01 -5 mm auf. An der Ein- und Ausgangsöffnung (6, 6') des Kanals ist jeweils ein Flüssigkeitsreservoir (3, 3') angeschlossen, wodurch ein kommunizierendes System entsteht. Der Boden

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

und/oder Deckel dieser Kammer ist aus optisch hochwertigem Kunststoff und kann funktionalisiert sein. Die Ein- und Ausgangsbereiche des Kanals können durch eine Abrundung (7) der Kanalkanten oder eine Oberflächenbehandlung derart ausgebildet sein, dass es zu keiner Tropfenbildung und somit zu keiner Behinderung des Flusses kommt. Bei einem Verfahren zur Probenpräparation für lichtmikroskopische Untersuchungen wird ein Probenfluss durch ein System kommunizierender Röhren erzeugt, indem ein Reservoir einer Lösung mit der Probe über einen dünnen Kanal mit wenigstens einem weiteren Reservoir verbunden und der Füllstand der Reservoirs zu Beginn der Untersuchung unterschiedlich ist.

Flusskammer

Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Flusskammer für lichtmikroskopische und lichtspektroskopische Untersuchungen nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1 und ein Verfahren zur Probenpräparation für lichtmikroskopische Untersuchungen nach Anspruch 16.

Insbesondere betrifft die Erfindung eine Flusskammer mit der sowohl bewegliche als auch immobilisierte Moleküle, Makromoleküle oder Zellen mit verschiedenen lichtmikroskopischen sowie spektroskopischen Techniken (z.B. hochauflösende Mikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie, Phasenkontrastmikroskopie, konfokale Mikroskopie, etc.) untersucht werden können.

Stand der Technik

Objektträger und Probenschalen für zu untersuchende Proben werden bei den verschiedensten Untersuchungsmethoden eingesetzt und müssen daher vielen unterschiedlichen Anforderungen genügen. Beispielsweise werden viele biologisch-medizinische Untersuchungen mit Hilfe von lichtmikroskopischen und/oder spektroskopischen Techniken durchgeführt. Neben der reinen Lichtmikroskopie (z.B. zur Zelluntersuchung) werden immer öfter Methoden der Hochauflösenden-, Fluoreszenz-, Phasenkontrast- oder der Konfokalen-Mikroskopie sowie der UV-Spektroskopie verwendet. Auch werden Kombinationen dieser Methoden eingesetzt. Insbesondere die Analyse von Fluoreszenzsignalen ist von entscheidender Bedeutung, um spezifische Reaktionen nachzuweisen.

Dies geschieht zumeist über die qualitative Analyse der Fluoreszenz einer Lösung welche die zu untersuchenden Moleküle, Makromoleküle oder Zellen enthält (z.B. via Mikroskopie oder Spektroskopie). Dabei befinden sich sowohl die zu untersuchende Substanz, als auch ‚Nachweismoleküle‘ für diese Substanzen, wie z.B. Antikörper, in Lösung. Dies

führt dazu, dass sowohl verhältnismäßig große Mengen der nachzuweisenden Moleküle als auch der zu untersuchenden Substanz (oder Zellen) verwendet werden müssen.

Die für derartige Untersuchungen verwendeten Probenkammern, in denen sich die Lösung mit den Substanzen befindet, sind zumeist aus Glas oder Quarzglas. Kunststoffbehälter werden, wegen der schlechten optischen Eigenschaft der meisten Kunststoffe (im Vergleich zu Glas), für diese Art der Untersuchungen kaum verwendet. Ausnahmen bilden Kunststoffschalen, die zum Mikroskop oder Spektrometer hin offen sind, so dass das vom Molekül emittierte Licht keinen Kunststoff auf seinem Weg zum Detektor hin durchlaufen muss.

Aus der DE 3102571 A1 ist beispielsweise eine Petrischale bekannt, die aus Kunststoff besteht und einen dünnen Boden von 0,17 mm für die Mikroskopie aufweist. Diese wird insbesondere für die Zellmikroskopie verwendet, weist jedoch kein Durchflusssystem auf. Sie besitzt auch kein Kanalsystem oder Reservoir, um einen definierten Fluss anzulegen. Auch sind bei dieser Schale keine speziellen, auf die zu untersuchenden Substanzen abgestimmte Modifikationen des Kunststoffes vorgesehen.

Aus der US 5170286 ist eine Beobachtungskammer für Mikroskopie in Verbindung mit einem angeschlossenen Flusssystem bekannt. Es handelt sich dabei um eine „Sandwich“-Konstruktion, die im wesentlichen aus einer speziellen Halterung besteht, in die Mikroskopie-Deckgläser eingelegt werden, welche durch Deckplatten fixiert werden. Dieses System besteht somit aus mindestens fünf verschiedenen Elementen die vor jedem Experiment zusammengefügt werden müssen. Dadurch ist z.B. ein steriles Arbeiten nur durch aufwendige Vorkehrungen gewährleistet. Auch müssen die verwendeten Deckgläser, die Halterung und die Deckplatten zwischen den Experimenten gereinigt werden. Der Durchfluss muss in dieser Kammer durch Schlauchverbindungen zu einem nicht auf der Kammer aufgebrachten Reservoir erzeugt werden. Dies beinhaltet das Risiko der Luftblasenbildung im Flusssystem.

Eine Oberflächenbehandlung oder Funktionalisierung zur spezifischen Immobilisierung von Molekülen oder Zellen der eingesetzten Deckgläser ist nicht vorgesehen. Auch müssen die eingesetzten Deckgläser durch Dichtungsringe abgedichtet werden. Dies kann erfahrungsgemäß oft zu Undichtigkeiten führen und dazu, dass in der Lösung befindliche

Moleküle aufgrund eines Kontaktes mit dem Dichtungsring ihre funktionelle Struktur verändern oder an diesem absorbieren. Dies gilt auch für die Halterung, in welcher die Kanäle eingebracht sind.

In der WO 97/38300 ist ein Mikrokanalsystem aus Acryl beschrieben, das der elektrophoretischen Auftrennung dient. Der Mikrokanal wird jedoch nicht zum Durchspülen von Flüssigkeiten oder zur hochauflösenden Mikroskopie verwendet. Auch hat Acryl keine ausreichend guten optischen Eigenschaften, um hochwertige Mikroskopie durchzuführen. Die Innenwände dieses Kanalsystemes werden auch nicht oberflächenbehandelt, mit dem Zweck dort spezifische Reaktionen analysieren zu können. Die Analyse der in dieses Kanalsystem eingebrachten Makromoleküle findet in einem eingebrachten Gel statt. Auch werden in den Kanal eingebrachte Moleküle nicht durch einen angelegten hydrodynamischen Fluß, sondern durch Verwendung von elektrischen Feldern bewegt.

Die meisten Techniken mit herkömmlichen Probenkammern erlauben nur eine quantitative und keine qualitative Analyse der Signale. Auch stellt sich der Lösungsmittelaustausch, z.B. bei der Verwendung einer Glasküvette zur Verdünnung, als sehr aufwendig dar. Der einfache Austausch von Flüssigkeiten in einer Probenkammer ist jedoch notwendig, um spezielle Reaktionen von Molekülen in der Flüssigkeit mit anderen Molekülen, Makromolekülen, Zellen, etc. nachzuweisen, oder um überflüssige Moleküle, welche sich in der Flüssigkeit befinden, herauszuspülen. Zudem können überschüssige Moleküle das Fluoreszenzsignal oder Spektrum des zu untersuchenden Moleküls oder Molekülkomplexes abschwächen oder auslöschen.

Beschreibung der Erfindung

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Flusskammer zu entwickeln, die einen schnellen und einfachen Durchfluss und Austausch von Flüssigkeiten erlaubt, die zudem eine problemlose Durchführung der genannten Untersuchungen und eine Immobilisierung von Molekülen, Makromolekülen oder ganzen Zellen ermöglicht und durch die sich die für eine Untersuchung erforderliche Menge an Nachweismolekülen reduzieren lässt. Ferner soll eine Flusskammer bereitgestellt werden, die einfach herzustellen und zu bedienen ist.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es ein Verfahren bereit zu stellen, das die Durchführung der genannten Untersuchungsmethoden erleichtert und neue Untersuchungsmöglichkeiten eröffnet.

Diese Aufgabe wird durch eine Flusskammer nach den kennzeichnenden Merkmalen des Anspruchs 1 und durch das Verfahren nach Anspruch 16 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen gehen aus den Unteransprüchen hervor.

Demnach weist eine Flusskammer aus Kunststoff als Objektträger für lichtmikroskopische Untersuchungen in einer Grundplatte wenigstens einen Kanal mit einer bevorzugten Breite von 0,01 - 20,0 mm und einer bevorzugten Höhe von 0,01 – 5 mm auf. Sowohl die Eingangsöffnung als auch die Ausgangsöffnung des Kanals ist an ein auf der Oberfläche angeordnetes Flüssigkeitsreservoir angeschlossen. Durch die Verbindung der beiden Reservoirs durch den Kanal kann ein kommunizierendes System entstehen bzw. entsteht ein kommunizierendes System.

Vorzugsweise sind auf der einen Oberfläche der Grundplatte die wenigstens zwei Flüssigkeitsreservoirs und an der gegenüberliegenden Oberfläche der Grundplatte der wenigstens eine Kanal angeordnet. Damit kann die Flusskammer in vorteilhafter Weise für Verfahren der inversen Mikroskopie verwendet werden. Insbesondere wird das Mikroskop nicht durch die Flüssigkeitsreservoirs behindert, da sich diese auf der anderen Seite der Grundplatte befinden.

Vorteilhafterweise umfasst der wenigstens eine Kanal einen in der Grundplatte ausgebildeten Graben. Durch ein Aufbringen einer Abdeckung auf der Grundplatte der Flusskammer kann der Graben geschlossen und somit ein geschlossener Kanal gebildet werden. Die Abdeckung kann beispielsweise in Form einer Folie ausgebildet sein. Das kommunizierende System entsteht dann durch das Aufbringen der Abdeckung. Somit wird erfindungsgemäß eine Flusskammer mit einer Abdeckung bereitgestellt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird ein Probenfluss durch ein System kommunizierender Röhren erzeugt, indem ein Reservoir einer Lösung mit der Probe über einen dünnen Kanal mit wenigstens einem weiteren Reservoir verbunden und der Füllstand der

Reservoirs zu Beginn der Untersuchung unterschiedlich ist. Vorzugsweise wird zur Durchführung des Verfahrens ein Flusskammer verwendet, wie sie oben beschrieben ist.

Eine zu untersuchende Probenflüssigkeit wird zur Untersuchung in eines der Flüssigkeitsreservoirs eingefüllt. Das andere Reservoir kann zunächst leer bleiben oder mit einer passenden Lösung zum Teil gefüllt werden. Wesentlich ist jedoch, dass der Flüssigkeitsstand in den beiden Reservoirs unterschiedlich ist. In diesem Fall fließt die Flüssigkeit aufgrund von Gravitations- und Kapillarkräften durch den Kanal, ohne dass zusätzliche Hilfsmittel erforderlich sind.

Mit der erfindungsgemäßen Flusskammer wird ein unkomplizierter und zugleich zuverlässiger Durchfluss einer zu untersuchenden Probe durch den Kanal sichergestellt. Untersuchungen von Molekülen, etc. mit Hilfe dieser Flusskammer können daher schnell und effizient durchgeführt werden, da auch kein kompliziertes externes Kanalsystem angeschlossen werden muss. Durch die unmittelbare Nähe der Probenreservoirs am Untersuchungsort, d. h. dem Kanal, kann die erforderliche Probenmenge stark reduziert werden. Die vorgenannten Nachteile herkömmlicher Probenkammern werden daher vermieden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung für hochempfindliche Untersuchungsmethoden besteht die Flusskammer aus einem optisch hochwertigen Kunststoff, d. h. der Kunststoff weist keine Doppelbrechung und/oder Autofluoreszenz auf. Hierfür können beispielsweise cyclische Olefine und Polycarbonat verwendet werden. Ferner weist der Boden und/oder die Decke des Kanals der Flusskammer, entsprechend den Erfordernissen der verwendeten Untersuchungsmethode bevorzugt eine Dicke auf, die geringer als 190 μm ist. Dadurch werden optimale Eigenschaften für eine Vielzahl von Untersuchungsverfahren erreicht.

Die Flüssigkeitsreservoirs haben vorteilhafterweise einen Durchmesser von 1 – 20 mm und eine Höhe von 3 – 30 mm. Ferner können sie trichterförmig ausgebildet sein, wobei dieser Trichter in die Ein- bzw. Ausgangsöffnung des Kanals mündet. Dadurch verbleiben keine Rückstände der Probe in dem Flüssigkeitsreservoir und die notwendige Probenmenge für eine Untersuchung kann weiter reduziert werden.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung umfassen die Flusskammer und/oder die Abdeckung wenigstens einen Bereich mit einer vorherbestimmten Gasdurchlässigkeit. Diese Gasdurchlässigkeit kann insbesondere nur für bestimmte Gase, wie CO₂, O₂ und N₂, ausgebildet sein. Dadurch können bevorzugte Begasungen beispielsweise von Zellen in dem Flusssystem durch unterschiedliche, die Kammer umgebende Gasatmosphären ermöglicht werden. Die lokale Gaspermeabilität kann insbesondere nicht nur durch das Material sondern auch durch die Materialdicke eingestellt werden. Weiterhin können unterschiedliche Bereiche eine unterschiedliche Gasdurchlässigkeit aufweisen, so dass nur bestimmte Bereiche der Kammer mit bestimmten Gasen versorgt werden.

Vorzugsweise können mehrere Abdeckungen (z.B. Folien) übereinander auf der Grundplatte angeordnet sein. Durch ein Entfernen oder Hinzufügen von Abdeckungen kann die Gaspermeabilität verändert werden. Insbesondere können die Abdeckungen derart angeordnet werden, dass sie sich leicht entfernen lassen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Flusskammer sind die Kanten des Kanals, mit welchen dieser an die Ein- und Ausgangsöffnungen grenzt, abgerundet. Dadurch kommt es am Ausfluß bzw. am Einfluß der Probenflüssigkeit nicht zur Bildung eines Tropfens aufgrund von Oberflächenspannung und es wird ein ungehindertes Weiterfließen der Flüssigkeit sichergestellt. Die Oberflächen des Kanals können im Bereich des Aus- und Einflusses, je nach den vorgegebenen Eigenschaften der verwendeten Flüssigkeit, auch eine hydrophile oder hydrophobe Oberfläche besitzen, um Benetzungsphänomene für den Flüssigkeitstransport zu nutzen.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung weist wenigstens ein Bereich der Flusskammer und/oder der Abdeckung eine Oberflächenbeschichtung auf. Dadurch kann eine vorbestimmte Adhäsion (z.B. besonders stark oder schwach) von Zellen erzielt werden. Entsprechende Oberflächenstrukturen können zwischen 10µm und einigen Zentimetern liegen.

Für bestimmte Untersuchungsmethoden, wie z. B. Wechselwirkungsuntersuchungen zwischen Molekülen ist es wünschenswert, die Moleküle, Makromoleküle oder Zellen zu immobilisieren. Hierfür kann eine innere Oberfläche des Kanals oberflächenbehandelt oder funktionalisiert sein, z. B. durch Molekülgruppen, wie -COOH, -NH₂, Ketone, Alkohole

oder durch Makromoleküle, wie DNA oder Proteine. Die auf dieser Oberfläche immobilisierten Proben können bei Reaktion mit einem in Lösung befindlichen Stoff (z. B. Molekül) eine charakteristische Änderung ihres Spektrums aufweisen oder ein charakteristisches Fluoreszenzsignal aussenden. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Flusskammer ist es möglich, die in Lösung befindlichen Moleküle herauszuspülen, so dass dieses Signal störungsarm quantitativ analysiert werden kann.

Die Kammer, d.h. die Flüssigkeitsreservoir und die Grundplatte, besteht in einer bevorzugten Ausführungsform aus einem Stück. Es gibt somit keine Elemente, die vor der Benutzung gereinigt werden müssen, und sie kann mit geringem Aufwand steril gehalten werden. Sie muss auch vor der Benutzung nicht aufwendig zusammengefügt werden. Ist die Flusskammer mit zur Oberfläche offenen Kanälen (Gräben), wie oben beschrieben, ausgebildet, muß dann lediglich noch eine Abdeckung aufgebracht werden. In dieser Ausführungsform ist sie normalerweise auch nur zur einmaligen Benutzung vorgesehen.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung ist die Flusskammer als Spritzgußteil ausgebildet. Damit ergibt sich eine besonders einfache und kostengünstige Herstellungsweise.

Gemäß einer weiteren vorteilhaften Weiterbildung ist auf der Oberfläche der Grundplatte, an der der wenigstens eine Kanal angeordnet ist, ein Rahmen angeordnet. Der Rahmen kann insbesondere entlang des gesamten oder eines Teils des Umfangs der Grundplatte angeordnet sein. Damit wird eine präzise Anordnung der Abdeckung auf der Grundplatte ermöglicht. Die Höhe des Rahmens kann gleich der Dicke der Abdeckung sein. Gemäß einer vorteilhaften Alternative ist der Rahmen höher als die Dicke der Abdeckung, wodurch der Rahmen auch als Abstandhalter dient, was ein zerkratzen der Abdeckung verhindert. Vorzugsweise weist der Rahmen eine Höhe zwischen $1\mu\text{m}$ und 1mm und eine Breite von $1\mu\text{m}$ und 1mm auf. Ein weiterer Vorteil des Rahmens besteht darin, dass er die Flusskammer mechanisch stabilisiert und insbesondere eine Verformung der Kammer bei einem Abkühlen in einer Spritzgußform verringert oder minimiert.

Gemäß einer vorteilhaften Alternative umfasst die Abdeckung einen Rahmen. Beispielsweise ist eine Folie auf oder in einen Rahmen gespannt. Diese Abdeckung kann fest mit der Grundplatte der Flusskammer verbunden werden und diese stabilisieren.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung ist wenigstens ein Flüssigkeitsreservoir derart ausgebildet, dass bei verschlossener Ein- und Ausgangsöffnung des angeschlossenen Kanals eine Steckereinrichtung zum luftdichten Verschließen in das Flüssigkeitsreservoir eingeführt werden kann. Unter einer Steckereinrichtung zum luftdichten Verschließen ist eine Steckereinrichtung zu verstehen, die, wenn sie mit dem Flüssigkeitsreservoir in Eingriff gebracht ist, dieses luftdicht verschließen kann. Bei einem Einführen einer solchen Steckereinrichtung, beispielsweise einer gefüllten Pipette, kann also die hierdurch verdrängte Luft aus dem Flüssigkeitsreservoir nach außen entweichen, selbst wenn der angeschlossene Kanal beispielsweise mit Flüssigkeit gefüllt ist. Eine Möglichkeit bietet eine seitlich in dem Flüssigkeitsreservoir in geeigneter Höhe angeordnete Öffnung zum Entlüften. Gemäß einer bevorzugten Alternative ist das Flüssigkeitsreservoir in sich zur Öffnung konisch erweiternder Form ausgebildet. Solche Flüssigkeitsreservoir bieten den Vorteil, dass Steckereinrichtungen zum luftdichten Verschließen eingeführt werden können, ohne dass ein vorhandener Flüssigkeitspegel verändert wird, solange sich die Steckereinrichtung oberhalb des Flüssigkeitspegels befindet. Vorzugsweise wird der Flüssigkeitspegel und/oder die Form des Flüssigkeitsreservoirs so gewählt, dass die Steckereinrichtung oberhalb des Flüssigkeitspegels mit dem Flüssigkeitsreservoir in Eingriff gebracht wird, insbesondere also die Flüssigkeit höchstens berührt aber nicht in die Flüssigkeit eintaucht.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung aller zuvor beschriebenen Flusskammern ist wenigstens eine Ein- oder Ausgangsöffnung eines Kanals auf einer vorbestimmten Höhe eines Flüssigkeitsreservoirs angeordnet. Dies hat einerseits den Vorteil, dass erst ab einem bestimmten Flüssigkeitsstand die Flüssigkeit in den Kanal fließen kann. Andererseits kann damit nach dem Prinzip der kommunizierenden Röhren ein vorbestimmter Flüssigkeitsstand in anderen Flüssigkeitsreservoirs eingestellt werden.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Bevorzugte Ausführungsformen einer Flusskammer gemäß der vorliegenden Erfindung werden an Hand der Zeichnung näher erläutert. In dieser stellen dar:

Fig. 1: die perspektivische Ansicht einer Flusskammer nach der vorliegenden Erfindung,

Fig. 2: einen Längsschnitt durch eine erfindungsgemäße Flusskammer,

Fig. 3: einen vergrößerten Ausschnitt der Flusskammer aus Figur 2,

Fig. 4: einen Längsschnitt durch eine weitere Ausführungsform der Flusskammer,

Fig. 5: eine perspektivische Ansicht der Ausführungsform der Flusskammer aus Figur 4,
und

Fig. 6: einen Längsschnitt durch eine weitere Ausführungsform einer Flusskammer.

In Figur 1 ist eine Ausführungsform einer Flusskammer 1 mit einer Grundplatte 2 und zwei kreisförmigen Flüssigkeitsreservoirien 3 und 3' gezeigt. Die Flusskammer 1 besteht aus Kunststoff, wobei hierfür bevorzugt Polycarbonat oder cyclische Olefine verwendet werden. cyclische Olefine weisen eine geringe Autofluoreszenz sowie eine geringe Doppelbrechung auf und bieten somit optimale optische Eigenschaften. Die Grundplatte 2 hat die typischen Außenmasse von ca. 26 x 76 mm. In dieser Form ist die Kammer auf einfache Weise auf einem Probentisch eines beliebigen Mikroskops zu befestigen. Außerdem kann sie leicht sterilisiert und steril gehalten werden.

Figur 2 stellt einen Schnitt in Längsrichtung durch Figur 1 dar. Innerhalb der Grundplatte 2 verläuft ein Kanal 4 mit Ein- und Ausgangsöffnungen 6 und 6', die nach oben aus der Grundfläche 2 weisen. Die Flüssigkeitsreservoirie 3 und 3' werden durch den Kanal 4 miteinander verbunden. Die Reservoirie weisen typischerweise einen Außendurchmesser von 18 mm und eine Höhen von 18 mm auf. Der Durchmesser kann jedoch von 1-30 mm und die Höhe von 3-30 mm variieren. Bei einem unterschiedlichen Flüssigkeitsstand in den beiden Reservoirien kann die Flüssigkeit aufgrund der Gravitation und der Kapillarkräfte durch den Kanal fließen.

Zur Bildung eines Kanals 4, der knapp unterhalb der unteren Oberfläche der Platte verläuft, ist in die Grundplatte 2 eine Aussparung bzw. ein Graben eingebracht, die zwischen 0,1 - 5 mm tief und 0,1 - 3 mm breit ist. Der Kanal könnte auch durch eine entsprechende Aussparung knapp unter der oberen Oberfläche der Platte vorgesehen sein. Typischerweise wird die Grundplatte 2 als Spritzgußteil hergestellt; insbesondere werden

Grundplatte und Flüssigkeitsreservoir als ein Spritzgußteil hergestellt. Über der Aussparung in der Grundplatte 2 ist eine Folie 5 angeordnet, die die Aussparung abdeckt und den Boden bzw. den Deckel des Kanals 4 bildet. Die Folie kann z.B. durch Verkleben, Heißpressen oder laminieren über der Grundplatte angebracht werden. Außerdem kann die Folie 5 schon vor dem Aufbringen auf die Grundplatte physikalisch oder chemisch oberflächenbehandelt werden, um z. B. eine Immobilisierung der Probe zu ermöglichen, wie vorher beschrieben wurde.

Um die Flusskammer 1 der hochauflösenden Mikroskopie zugänglich zu machen, ist die Folie 5 in einem für die Untersuchungen wesentlichen Bereich dünner als 0,2 mm, typischerweise zwischen 0,1 und 0,2 mm. Die Folie 5 ist aus einem hochtransparenten Kunststoff. Um einen Kondensor eines Mikroskopes einsetzen zu können, sind die hierfür wesentlichen Bereiche der Flusskammer 1 nicht höher als 10 mm. Die Grundplatte 2 kann dann ebenfalls aus hochtransparenten Kunststoffen sein.

In Figur 3 ist die Anordnung des Flüssigkeitsreservoirs 3 über einer Ein- bzw. Ausgangsöffnung 6, 6' gezeigt. Die Kante am Übergang des Kanals 4 in die Eingangsöffnung 6 weist eine Abrundung 7 in Form eines Meniskus auf. In einem Kanalbereich vor der Öffnung 6, kann die Oberfläche des Kanals hydrophil oder hydrophob ausgebildet sein. Dies kann wiederum z. B. durch eine Oberflächenbehandlung der Folie 5 oder der Aussparung in der Grundplatte 2 vor dem Aufbringen der Folie erfolgen. Durch die Abrundung 7 oder die eben geschilderte Oberflächenbeschaffenheit können Oberflächenspannungen und Tropfenbildung, die den Flüssigkeitsstrom behindern, vermieden werden.

Die Ausführungsform der Flusskammer 1 in Figur 4 weist Flüssigkeitsreservoir 3 und 3' auf, die trichterförmig in die Ein- und Ausgangsöffnungen 6 und 6' münden. In Figur 5 sind drei nebeneinander verlaufende Kanäle 4a, 4b und 4c mit den entsprechenden Flüssigkeitsreservoir 3a, 3a', 3b, 3b', 3c und 3c' gezeigt. Als eine Weiterentwicklung kann die Anzahl der Kanäle zwischen 12 und 96 Stück betragen. Die Außenmasse der Grundplatte betragen dann typischerweise 126 X 85 mm.

In Fig. 6 ist eine Ausführungsform einer Flusskammer 1 mit einem sich konisch erweiternden Flüssigkeitsreservoir 3 gezeigt. Das Flüssigkeitsreservoir 3 ist bis zu einem vorherbestimmten Pegel 8 mit Flüssigkeit gefllt, wobei sich der Pegel nach dem Prinzip der

kommunizierenden Röhren aus der Höhe der Ausgangsöffnung 6' des Reservoirs 3' ergibt. In das Reservoir 3 kann eine Steckereinrichtung 9 eingeführt werden, deren Form an die Form des Flüssigkeitsreservoirs 3 angepasst ist. Die Steckereinrichtung 9 ist mit einem mit Flüssigkeit gefüllten Schlauch 10 verbunden. Sobald die Steckereinrichtung 9 mit dem Flüssigkeitsreservoir 3 in Eingriff gebracht ist, verschließt sie das Reservoir luftdicht. Die Steckereinrichtung 9 wird dann flächig an der Innenseite des Reservoirs 3 anliegen, so dass sich zwischen der Innenseite des Reservoirs 3 und der zur Innenseite des Reservoirs gerichteten Seite der Steckereinrichtung 9 keine Flüssigkeit befinden wird. Damit kann das Reservoir 3 und der Kanal 4 für einen Flüssigkeitswechsel vollständig durchgespült werden, ohne dass Flüssigkeitsreste in dem Reservoir 3 verbleiben. Der Flüssigkeitspegel 8 ist so gewählt, dass die in Eingriff gebrachte Steckereinrichtung 9 direkt oberhalb der Flüssigkeitsoberfläche angeordnet sein wird. Zwischen Flüssigkeit und Steckereinrichtung befindet sich dann keine Luftblase mehr. Die Anchrägung der Ausgangsöffnung 6' erlaubt ein optimales Abfließen in das Reservoir 3'.

Die gezeigten Ausführungsformen sind beispielhaft und es ist offensichtlich, dass eine Vielzahl weiterer Ausgestaltungen einer Flusskammer im Sinne der vorliegenden Erfindung möglich sind, wie z.B. die Kreuzung von zwei Kanälen oder das Zusammenlaufen von zwei Kanälen in einem Einzigen.

Bezugszeichen

- 1 Flusskammer
- 2 Grundplatte
- 3 Flüssigkeitsreservoir
- 3' Flüssigkeitsreservoir
- 3a Flüssigkeitsreservoir
- 3a' Flüssigkeitsreservoir
- 3b Flüssigkeitsreservoir
- 3b' Flüssigkeitsreservoir
- 3c Flüssigkeitsreservoir
- 3c' Flüssigkeitsreservoir
- 4 Kanal
- 4a Kanal
- 4b Kanal
- 4c Kanal
- 5 Folie
- 6 Eingangsöffnung
- 6' Ausgangsöffnung
- 7 Abrundung
- 8 Flüssigkeitspegel
- 9 Steckereinrichtung
- 10 Schlauch

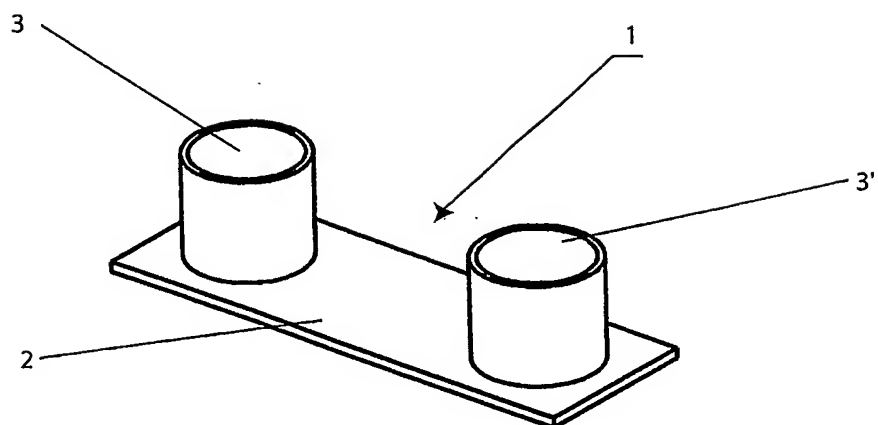
Patentansprüche

1. Flusskammer aus Kunststoff als Proben­träger für licht-mikroskopische Untersuchungen, dadurch gekennzeichnet, dass sie in einer Grundplatte (2) einen oder mehrere Kanäle (4) aufweist, wobei eine Ein- und Ausgangsöffnung (6, 6') eines Kanals jeweils an ein Flüssigkeitsreservoir (3, 3') angeschlossen ist und die Reservoirs mit dem einen oder den mehreren Kanälen ein kommunizierendes System darstellen.
2. Flusskammer nach Anspruch 1, wobei die Flüssigkeitsreservoirs (3, 3') auf einer Oberfläche der Grundplatte (2) und der wenigstens eine Kanal (4) an der gegenüberliegenden Oberfläche angeordnet sind.
3. Flusskammer nach Anspruch 1 oder 2, wobei der wenigstens eine Kanal (4) einen in der Grundplatte (2) ausgebildeten Graben umfasst.
4. Flusskammer nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Flusskammer als ein Stück ausgebildet ist.
5. Flusskammer nach Anspruch 4, wobei die Flusskammer als Spritzgußteil ausgebildet ist.
6. Flusskammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Kanal (4) eine Breite von 0,01 - 20,0 mm und eine Höhe von 0,01 - 5 mm aufweist.
7. Flusskammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Flüssigkeitsreservoirs (3, 3') direkt an die Ein- und Ausgangsöffnung (6, 6') eines Kanals anschließen.
8. Flusskammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Grundplatte (2) aus nicht doppelbrechendem und autofluoreszierendem Kunststoff besteht.

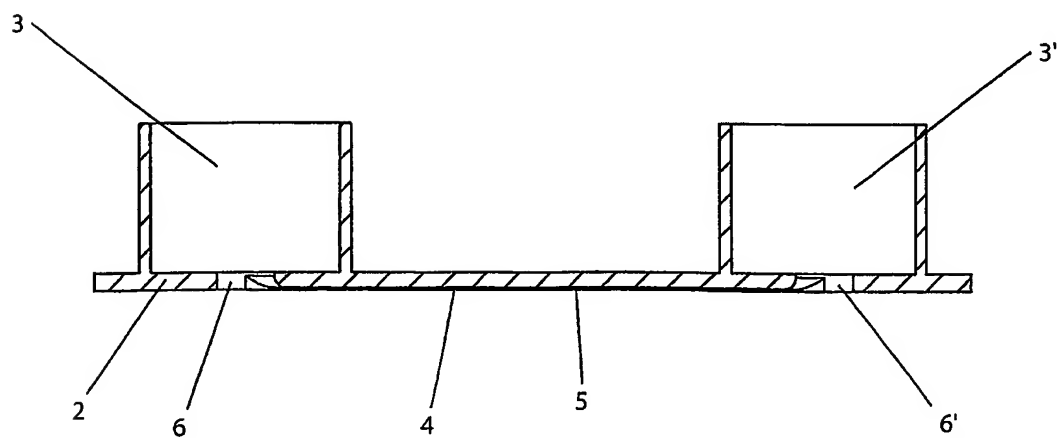
9. Flusskammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Grundplatte (2) aus cyclischen Olefinen oder Polycarbonat besteht.
10. Flusskammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Boden und/oder die Decke eines Kanals (4) eine Dicke von weniger als 0,2 mm aufweist und aus optisch hochwertigem Kunststoff besteht.
11. Flusskammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Flüssigkeitsreservoir (3, 3') einen Durchmesser von 1 – 20 mm und eine Höhe von 3 – 30 mm aufweist.
12. Flusskammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Flüssigkeitsreservoir (3, 3') trichterförmig in die Eingangsöffnung (6) und/oder Ausgangsöffnung (6') eines Kanals (4) mündet.
13. Flusskammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Kanal (4) an wenigstens einer der Kanten zur Ein- und/oder Ausgangsöffnung (6, 6') eine Abrundung (7) aufweist.
14. Flusskammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Bereiche der Kanalwände vor der Ein- und/oder Ausgangsöffnung eine hydrophobe oder hydrophile Oberfläche aufweisen.
15. Flusskammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine innere Oberfläche eines Kanals chemisch und/oder physikalisch oberflächenbehandelt und/oder durch reaktive Gruppen und/oder durch Makromoleküle funktionalisiert ist.
16. Flusskammer nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktiven Gruppen aus -COOH, -NH₂, Ketonen, Alkoholen bestehen.
17. Flusskammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Flusskammer wenigstens einen Bereich mit einer vorherbestimmten Gasdurchlässigkeit aufweist.

18. Flusskammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens zwei Kanäle (4) in der Grundplatte (2) gekreuzt sind.
19. Flusskammer nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens zwei Kanäle (4) in der Grundplatte (2) in einem Winkel von 90° gekreuzt sind.
20. Flusskammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens zwei Kanäle (4) zu einem Kanal zusammengeführt sind.
21. Flusskammer nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei wenigstens ein Flüssigkeitsreservoir (3, 3') derart ausgebildet ist, dass bei verschlossener Ein- und/oder Ausgangsöffnung (6, 6') des angeschlossenen Kanals (4) eine Steckereinrichtung zum luftdichten Verschließen in das Flüssigkeitsreservoir eingeführt werden kann.
22. Flusskammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei wenigstens eine Ein- und/oder Ausgangsöffnung (6, 6') eines Kanals (4) auf einer vorherbestimmten Höhe eines Flüssigkeitsreservoirs (3, 3') angeordnet ist.
23. Verfahren zur Probenpräparation für lichtmikroskopische Untersuchungen, insbesondere unter Verwendung einer Flusskammer nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass ein Probenfluss durch ein System kommunizierender Röhren erzeugt wird, indem ein Reservoir einer Lösung mit der Probe über einen dünnen Kanal mit wenigstens einem weiteren Reservoir verbunden und der Füllstand der Reservoirs zu Beginn der Untersuchung unterschiedlich ist.

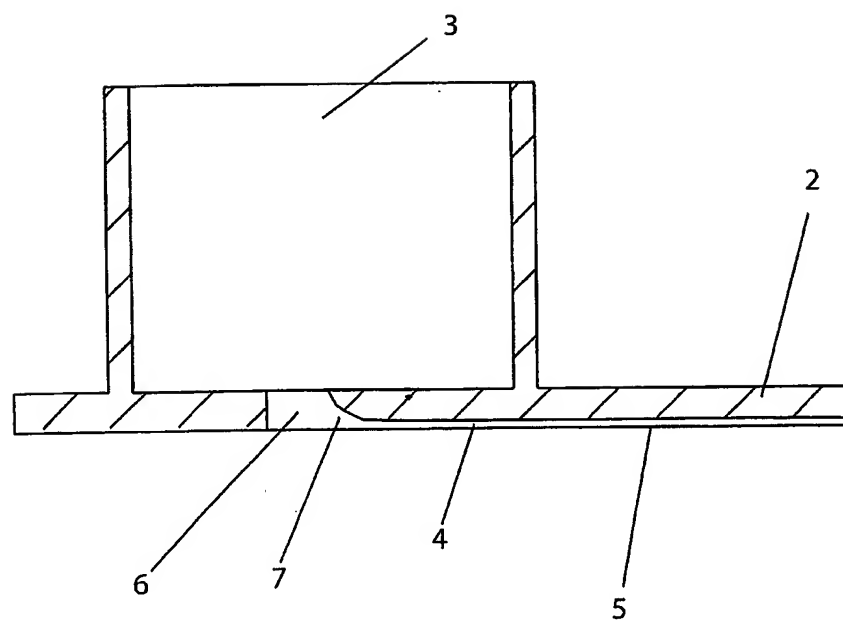
Figur 1



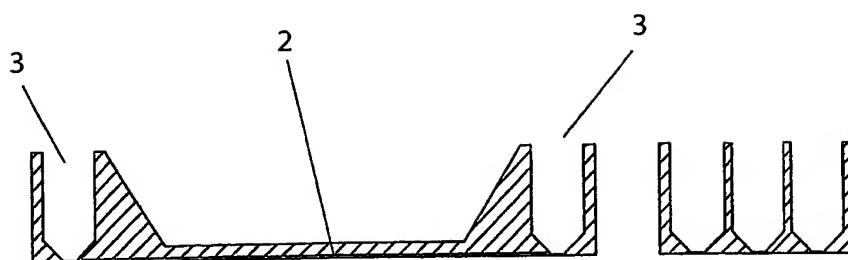
Figur 2



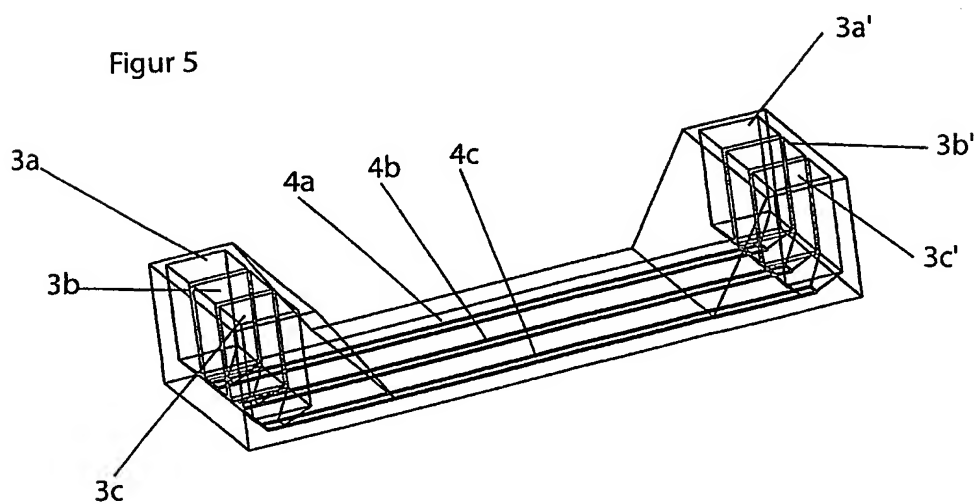
Figur 3



Figur 4



Figur 5



Figur 6

